

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3028569 A1**

⑤① Int. Cl. 3:
C12M1/00
G 01 N 27/26

②① Aktenzeichen:	P 30 28 569.9
②② Anmeldetag:	28. 7. 80
④③ Offenlegungstag:	25. 2. 82

⑦① Anmelder:
Kaufmann, Konrad, Dipl.-Phys. Dr., 3400 Göttingen, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤④ Biophysikochemische Anordnung, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie Fühler mit einer solchen Anordnung

DE 3028569 A1

DE 3028569 A1

Patentansprüche

1. Auf Änderungen der Umgebungsbedingungen durch Änderung
5 ihrer elektrischen Leitfähigkeit ansprechende biophysiko-
chemische Anordnung, bestehend aus einer in ein elek-
trisch leitendes flüssiges Milieu eintauchenden Membran,
deren elektrische Leitfähigkeit von dem sie umgebenden
Milieu abhängt, aus von der Membran getragenen Enzymmole-
külen und aus in dem flüssigen Milieu verteilten Substrat-
10 molekülen, welche sich in dem Milieu unter Katalyse durch
die Enzymmoleküle an einer Reaktion beteiligen, welche
zumindest ein Reaktionsprodukt ergibt, welches die elek-
trische Leitfähigkeit der Membran beeinflusst, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die effektive Konzentration von Enzym-
15 molekülen (36) auf der aktiven Oberfläche der Membran (32)
und die effektive Konzentration von Substratmolekülen
bzw. Clustern aus Substratmolekülen unter Berücksichti-
gung der Wanderungsgeschwindigkeit der Substratmoleküle
oder Substratmolekülcluster sowie unter Berücksichtigung
20 der Geschwindigkeit der durch die Enzymmoleküle kataly-
tisch geförderten Reaktion so gewählt sind, daß einzelne
impulsförmige Änderungen in der elektrischen Leitfähigkeit
der Membran (32) erhalten werden.
- 25 2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
die Membran (32) aus zwei Lipidschichten (26, 28) be-
steht.
- 30 3. Anordnung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß
die Membran aus Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin, Sphingo-
myelin oder Phosphatidylserin besteht.
- 35 4. Anordnung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß
die Membran aus aus Sojabohnen gewonnenem L- α -Phosphati-
dylcholin besteht.

5. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat Acetylcholin und das Enzym Acetylcholinesterase ist und daß das Milieu ein Ionen enthaltendes wässriges Milieu ist.
- 5 6. Anordnung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Acetylcholinesterase eine hochreine, native Acetylcholinesterase ist.
- 10 7. Anordnung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Acetylcholinesterase durch Affinitätschromatographie aus dem elektrischen Organ von Electrophorus Electricus hergestellt ist.
- 15 8. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das flüssige Milieu zusätzlich ATP, i.e. Adenosintriphosphat und die Membran (32) zusätzlich $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ enthält.
- 20 9. Anordnung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der ATPase etwa $10^{-4} - 10^{-3}$ Moleküle pro Molekül des Membranmaterials beträgt.
- 25 10. Verfahren zur Herstellung einer Membran nach einem der Ansprüche 2 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Oberfläche des flüssigen Milieus zu beiden Seiten einer Trägerfolie, welche mit einer Arbeitsöffnung versehen ist, die zunächst über der freien Oberfläche des flüssigen Milieus liegt, durch Spreiten eine monomolekulare Lipidschicht hergestellt wird, auf einer der Lipidschichten durch Spreiten einer verdünnten Enzymlösung die Enzymmoleküle aufgebracht werden und die Trägerfolie dann mit ihrer Arbeitsöffnung langsam in das Milieu hineinbewegt wird.
- 30 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß
- 35

als Lipid L- α -Phosphatidylcholin verwendet wird und als wässriges Milieu eine auf pH 7 - 7,5 gepufferte wässrige K^+Cl^- oder Na^+Cl^- -Lösung verwendet wird, deren Temperatur zwischen 292 und 296° K beträgt.

5

12. Biologische Versuchsanordnung zur Untersuchung der Reaktionsabläufe an Enzymen, welche von der Oberfläche einer Membran getragen sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine biophysikochemische Anordnung nach einem der Ansprüche 1- 9 oder eine biophysikochemische Anordnung, die nach Anspruch 10 oder 11 hergestellt ist, aufweist, welche einen Abschnitt einer Trennwand (14) eines Behälters (10) bildet, der mit dem flüssigen Milieu gefüllt ist und dessen Abteile (16, 18) mit einem Leitfähigkeitsmesser (46, 52 bzw. 54) verbunden sind, und daß die das zu untersuchende Enzym tragende Membran in dasjenige Abteil (16) eintaucht, welches mit den zur biophysikochemischen Anordnung gehörenden Enzymmolekülen in Verbindung steht.

20

13. Versuchsanordnung nach Anspruch 12, gekennzeichnet durch eine nur für die Produkte der durch das zu untersuchende Enzym gesteuerten Reaktion durchlässigen Trennwand (80), welche zwischen der biophysikochemischen Anordnung und demjenigen Milieu angeordnet ist, in welches die Membran mit dem zu untersuchenden Enzym eintaucht.

25

14. pH-Messer, dadurch gekennzeichnet, daß er eine biophysikochemische Anordnung nach einem der Ansprüche 1- 9 oder eine biophysikochemische Anordnung, die nach Anspruch 10 oder 11 hergestellt ist, und einen zwei Abteile (16, 18) aufweisenden Behälter (10) für das flüssige Milieu aufweist, dessen die Abteile begrenzende Trennwand (14) zum Teil durch die Membran (32) der biophysikochemischen Anordnung gebildet ist, daß die Abteile (10, 18) des Be-

30

35

- hälters (10) mit einem Leitfähigkeitsmesser (46, 52 bzw. 54) verbunden sind und daß dasjenige Abteil (16) des Behälters, das mit den Enzymmolekülen der biophysikochemischen Anordnung kommuniziert, zugleich mit der Flüssigkeit in Verbindung steht, deren pH-Wert gemessen werden soll.
15. pH-Messer nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Abteil (16), das mit den Enzymmolekülen der biophysikochemischen Anordnung kommuniziert, über eine für Wasserstoffionen durchlässige weitere Membran mit der Flüssigkeit kommuniziert, deren pH-Wert gemessen werden soll.
16. Temperaturmesser, dadurch gekennzeichnet, daß er eine biophysikochemische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 - 9 oder eine biophysikochemische Anordnung, die nach Anspruch 10 oder 11 hergestellt ist, und einen zwei Abteile (16, 18) aufweisenden Behälter (10) für das flüssige Milieu aufweist, dessen die Abteile (16, 18) begrenzende Trennwand (14) zum Teil durch die Membran (32) der biophysikochemischen Anordnung gebildet ist, daß die Abteile (16, 18) des Behälters (10) mit einem Leitfähigkeitsmesser (46, 52 bzw. 54) verbunden sind, und daß zumindest dasjenige Abteil (16) des Behälters (10), das mit den Enzymmolekülen der biophysikochemischen Anordnung kommuniziert, thermisch an denjenigen Gegenstand ankoppelbar ist, dessen Temperatur gemessen werden soll.
17. Elektrischer Feldstärkemesser, dadurch gekennzeichnet, daß er eine biophysikochemische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 - 9 oder eine biophysikochemische Anordnung, die nach Anspruch 10 oder 11 hergestellt ist, und einen zwei Abteile (56, 62, 62') aufweisenden Behälter

- aus dielektrischem Material für das flüssige Milieu aufweist, dessen die Abteile begrenzende Trennwand zum Teil durch die Membran der biophysikochemischen Anordnung gebildet ist, daß die Abteile des Behälters mit einem Leitfähigkeitsmesser (46, 46', 54) verbunden sind, daß zumindest dasjenige Abteil (56) des Behälters, das mit den Enzymmolekülen der biophysikochemischen Anordnung kommuniziert, in den felderfüllten Raum bewegbar ist, und daß die Substratmoleküle im flüssigen Milieu in ionisierter Form vorliegen.
18. Feldmesser nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß zwei biophysikochemische Anordnungen (58 - 66; 58' - 66') symmetrisch zu beiden Seiten einer Quelle (68 - 76) für ionisierte Substratmoleküle angeordnet sind und den beiden biophysikochemischen Anordnungen zugeordnete Betriebschaltungen (46, 46') ausgangsseitig mit einem Differenzrechner (54) verbunden sind.
19. Strömungsmesser, dadurch gekennzeichnet, daß er eine biophysikochemische Anordnung nach einem der Ansprüche 1 - 9 oder eine biophysikochemische Anordnung, die nach Anspruch 10 oder 11 hergestellt ist, einen Rohrkörper (56) für den zu messenden Flüssigkeitsstrom und einen auf die Wand des Rohrkörpers (56) aufgesetzten Behälter (62) aufweist, daß die Membran der biophysikochemischen Anordnung eine in der Trennwand zwischen Rohrkörper (56) und Behälter (62) vorgesehene Öffnung (60) zumindest zum Teil verschließt, daß das Innere des Rohrkörpers (56) und das Innere des Behälters (62) mit einem Leitfähigkeitsmesser (46, 54) verbunden ist und daß stromauf der Membran der biophysikochemischen Anordnung eine Einrichtung (68 - 76) zum Einspeisen von Substratmolekülen und ggf. Ionen in den zu messenden Flüssigkeitsstrom vorgesehen ist.

20. Strömungsmesser nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet,
daß die Einspeiseeinrichtung (68 - 76) die Substratmole-
küle und ggf. die Ionen in die Randschicht des im Rohr-
körper laminar geführten Flüssigkeitsstromes einspeist.
5
21. Strömungsmesser nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet,
daß die Einspeiseeinrichtung einen mit der Randschicht
des Flüssigkeitsstromes kommunizierenden offenporigen
Körper (70) aufweist, der mit dem Innenraum eines Vor-
ratsbehälters in Verbindung steht, welcher eine Substrat-
10 moleküle und ggf. Ionen enthaltende Lösung enthält.
22. Strömungsmesser nach Anspruch 21, gekennzeichnet durch
eine Einrichtung (74, 76) zum Aufrechterhalten eines
15 konstanten Überdruckes im Vorratsbehälter (72).
23. Strömungsmesser nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet,
daß die Einspeiseeinrichtung ein von der Randschicht des
Flüssigkeitsstromes durchströmtes Venturirohr aufweist,
20 welches eine mit einem Vorratsbehälter für Substratmole-
küle und ggf. Ionen in Verbindung stehende Öffnung in
der Düsenwand aufweist.
24. Strömungsmesser nach einem der Ansprüche 19 - 23, dadurch
25 gekennzeichnet, daß stromauf der Einspeiseeinrichtung
eine zweite biophysikochemische Anordnung (58' - 66')
angeordnet ist und die Ausgänge zweier den beiden bio-
physikochemischen Anordnungen (58 - 66 bzw. 58' - 66')
zugeordneter Betriebsschaltungen (46, 46') mit den Ein-
30 gängen eines Differenzrechners (54) verbunden sind.

4
ZEPH
PATENTANWÄLTE

3028569

DR. ULRICH OSTERTAG

DR. REINHARD OSTERTAG

EIBENWEG 10, 7000 STUTTGART 70, TELEFON 0711/76 68 45, KABEL: OSPAT

Biophysikochemische Anordnung, Verfahren zu ihrer
Herstellung sowie Fühler mit einer solchen Anordnung

Anmelder: Dr. Konrad Kaufmann
Sternstr. 5
3400 Göttingen

Anwaltsakte: 978

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine biophysikochemische Anordnung gemäß dem Oberbegriff des Anspruches 1, ein Verfahren zu
5 ihrer Herstellung sowie Fühler mit einer solchen Anordnung.

Eine biophysikochemische Anordnung der eingangs angesprochenen Art ist in der Zeitschrift Experientia, Band 28 (1972),
Seiten 256 und 257 beschrieben. Sie reagiert auf das Zu-
10 geben von Substratmolekülen mit einer Änderung der Leitfähigkeit, welche unter Verwendung zu beiden Seiten der Membran in das flüssige Milieu eintauchenden Elektroden und eines üblichen Leitfähigkeitsmessers gemessen wird. Die Erhöhung der Leitfähigkeit nach Zugabe von Substrat-
15 molekülen und der Wiederabbau der erhöhten Leitfähigkeit erfolgt in Zeiträumen von größenordnungsmäßig einigen Minuten.

Es wurde nun herausgefunden, daß man eine meßbare Reaktion
20 der Leitfähigkeit der Membran auf die durch Enzymmoleküle katalysierte Reaktion auch dann noch erhält, wenn man gemäß Anspruch 1 die Anzahl der Enzymmoleküle auf dem aktiven Bereich der Membran ganz drastisch vermindert, soweit dies nur experimentell möglich ist (Konzentrationen von 10^{-4} -
25 10^{-3} Enzymmolekülen pro Molekül des Membranmaterials lassen sich ohne experimentelle Schwierigkeiten einstellen), und auch die Konzentration der im flüssigen Milieu vorhandenen Substratmoleküle drastisch herabsetzt, was ohne Schwierigkeiten möglich ist. Man erhält dann sehr rasche,
30 impulsförmige Änderungen der Leitfähigkeit der Membran, welche direkt der katalytischen Zersetzung eines Substratmoleküles bzw. eines Clusters (haufenförmige Zusammenballung) von Substratmolekülen zugeordnet werden kann.

35 Eine erfindungsgemäße biophysikochemische Anordnung ge-

stattet nicht nur eine Untersuchung der Dynamik von durch
oberflächengebundene Enzymmoleküle katalysierten Reaktionen,
man kann derartige biophysikochemische Anordnungen auch di-
rekt als preiswertes, sehr einfach und rasch in großen Stück-
5 zahlen herzustellendes Modell für Nervenmembranen verwenden.
Bei der erfindungsgemäßen biophysikochemischen Anordnung
werden nämlich bei Verwendung der auch in den lebenden Ner-
venzellen angefundene Enzyme, Substrate und Membranmaterialien
in vergleichbarem Milieu genau die gleichen Leitfähig-
10 keitskanäle wie bei synaptischen oder axonalen Membranen
in vivo gefunden. Dies bedeutet bei der Prüfung der Wirkung
von pharmakologischen Wirkstoffen auf Nerven eine erhebliche
Vereinfachung der in großer Anzahl durchzuführenden
Versuche und erlaubt auch eine Untersuchung der Dynamik
15 der Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Nervenmembran.

Vorteilhafte Einzelheiten im Aufbau einer erfindungsgemäßen
biophysikochemischen Anordnung sind in Unteransprüchen an-
gegeben.

20 Dabei wird insbesondere mit der Weiterbildung der Erfindung
gemäß Anspruch 9 eine noch näherkommende Nachbildung einer
natürlichen Nervenmembran erreicht. Eine biophysikochemi-
sche Anordnung gemäß Anspruch 9 läßt sich durch Zugabe von
25 Substratmolekülen genauso elektrisch erregen wie dies bei
Nervenmembranen der Fall ist.

Da eine biophysikochemische Anordnung gemäß der vorliegenden
Erfindung Elementarereignisse, nämlich die durch ein Enzym-
30 molekül katalytisch hervorgerufene Reaktion eines Substrat-
moleküles oder eines Substratmolekülclusters zu messen ge-
stattet, hat man in ihr allgemein einen sehr empfindlichen
Fühler, welcher sich auch auf verschiedene Weise zur Rea-
lisierung klassischer Fühler verwenden läßt, z.B. in einer
35 Versuchsanordnung zur Untersuchung von Reaktionsabläufen

an Enzymen (vergl. Anspruch 12), in einem pH-Messer (vergl. Anspruch 14), in einem Temperaturmesser (vergl. Anspruch 16), in einem Meßgerät für die elektrische Feldstärke (vergl. Anspruch 17) oder in einem Strömungsmesser (vergl. Anspruch 19).

Mit der Weiterbildung der Erfindung gemäß Anspruch 13 wird erreicht, daß eine direkte Kreuzreaktion zwischen dem zu untersuchenden Enzym/Substratsystem und dem Enzym/Substratsystem der biophysikochemischen Anordnung nicht möglich ist.

Mit der Weiterbildung der Erfindung gemäß Anspruch 15 wird erreicht, daß zusätzlich in der Flüssigkeit deren pH-Wert bestimmt werden soll, enthaltene Stoffe nicht auf das Enzym/Substratsystem der biophysikochemischen Anordnung einwirken kann.

Mit der Weiterbildung der Erfindung gemäß den Ansprüchen 18 und 24 wird die Empfindlichkeit des betreffenden Fühlers noch einmal verbessert.

Die Weiterbildung der Erfindung gemäß Anspruch 20 und 21 ist im Hinblick auf eine sparsame Verwendung von Substratmolekülen von Vorteil und fördert auch die Empfindlichkeit des Strömungsmessers, da dessen Ausgangssignal von dem Unterschied zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit der Substratmoleküle senkrecht zur Strömungsrichtung und der Strömungsgeschwindigkeit selbst abhängt.

Ein Strömungsmesser gemäß Anspruch 22 eignet sich besonders gut zur Erfassung kleiner Strömungsgeschwindigkeiten. Bei ihm ist die Zufuhr von Substratmolekülen und ggf. Ionen in den zu messenden Flüssigkeitsstrom absolut gleichbleibend.

35

Ein Strömungsmesser gemäß Anspruch 23 eignet sich dagegen besonders gut zur Messung hoher Strömungsgeschwindigkeiten.

Nachstehend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die beiliegende Zeichnung näher erläutert. In dieser zeigen:

- Figur 1: einen vertikalen Schnitt durch eine biophysikochemische Anordnung, welche zur Messung durch oberflächengebundene Enzyme katalysierter Reaktionen und zur pH-Messung geeignet ist, in einem Zwischenstadium ihrer Herstellung;
- Figur 2: einen vertikalen Schnitt durch den aktiven Bereich der Membran und eines benachbarten Abschnittes einer Membranträgerfolie in stark vergrößertem Maßstabe;
- Figur 3: eine schematische Darstellung eines Acetylcholinesterasemoleküles;
- Figur 4: einen Längsschnitt durch einen Strömungsmesser, welcher mit einer biophysikochemischen Anordnung arbeitet;
- Figur 5: einen Schnitt durch eine Versuchsanordnung zur Untersuchung durch oberflächengebundene Enzyme katalysierter Substratreaktionen;
- Figur 6: eine grafische Darstellung der Leitfähigkeit der Membran einer biophysikochemischen Anordnung nach Figur 1 in Abhängigkeit von der Zeit bei sehr geringer Konzentration der Enzymmoleküle auf dem aktiven Bereich der Membran und sehr geringer Konzentration der Substratmoleküle im flüssigen Milieu; und

Figur 7: eine ähnliche Ansicht wie Figur 6, wobei jedoch die Konzentration der Enzymmoleküle und der Substratmoleküle etwas größer gewählt ist.

5 Figur 1 zeigt einen schalenförmigen Behälter 10, in dessen Boden ein über die gesamte Breite verlaufender Schlitz 12 vorgesehen ist. Im Schlitz 12 ist eine Trennwand 14 strömungsmitteldicht verschiebbar, welche mit ihren seitlichen Rändern ebenfalls strömungsmitteldicht verschiebbar an den
10 Seitenwänden des Behälters 12 anliegt. Zur zusätzlichen Abdichtung kann an den Dichtstellen Silikonfett vorgesehen sein. Auf diese Weise sind durch den Behälter 10 und die Trennwand 14 zwei Abteile 16 und 18 vorgegeben, welche jeweils mit einer wässrigen Salzlösung gefüllt sind, z.B. mit
15 einer wässrigen, 1-molaren (Ionenstärke) K^+Cl^- oder Na^+Cl^- -Lösung, welche auf einen pH-Wert zwischen 7 und 7,5 gepuffert ist und auf eine Temperatur von 292 - 296° K eingestellt ist.

20 Die Trennwand 14 ist in ihrem oberen Abschnitt mit einer auf einer Seite schräg geneigte Wände aufweisenden Öffnung 20 versehen; welche durch eine dünne Folie 22 aus Tetrafluoräthylen überdeckt ist. Die Dicke der Folie 22 beträgt 25 μ , und in ihrer Mitte ist eine Arbeitsöffnung 24 mit
25 einem Durchmesser von etwa 100 μ angeordnet, z.B. mit einer dünnen Nadel eingestochen.

Auf die Oberfläche der in den Abteilen 16 und 18 befindlichen wässrigen Lösung wird jeweils eine monomolekulare
30 Schicht 26 bzw. 28 eines Lipides, vorzugsweise aus Sojabohnen hergestelltes L- α -Phosphatidylcholin aufgespreitet. Die Lipidschicht 26 ist ferner mit einer weiteren Schicht überschichtet, welche Enzymmoleküle, beim hier betrachteten Ausführungsbeispiel Acetylcholinesterase, enthält und
35 durch Spreiten eines Lösungstropfens 30 erhalten wird.

Senkt man die Trennwand 14 sehr langsam mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,5 mm/min ab, so wird von der Vorderseite und der Rückseite der Folie 22 die benachbarte Lipidschicht 26 bzw. 28 mitgenommen, und man erhält im Bereich der Arbeitsöffnung 24 eine molekulare Doppelschicht, welche eine Membran 32 bildet.

Weitere Einzelheiten bezüglich der an sich bekannten Methode zur Membranherstellung sind in der Zeitschrift Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Band 69 (1972), Seiten 3561 - 3566 beschrieben.

Der Lösungstropfen 30 enthält insgesamt 10^{-6} g (entspricht 10^{-12} mol) einer geschwänzten nativen Acetylcholinesterase, welche aus dem elektrischen Gewebe des Aales *Electrophorus Electricus* isoliert ist und durch Affinitätschromatographie in hochreinen Zustand gebracht ist. Dieses Reinigungsverfahren ist in der Zeitschrift Biochemical and Biophysical Research Communications, Band 79 (1977), Seiten 640 - 647 näher beschrieben. Bei der Reinigung wird darauf geachtet, daß nur die Enzymfraktionen mit den Sedimentationskoeffizienten S von 14 und 18 ins gereinigte Produkt gelangen.

Figur 2 zeigt schematisch einen in keiner Weise maßstäblichen Schnitt durch die Folie 22 im Bereich der Arbeitsöffnung 24. Man erkennt die beiden aus Lipidmolekülen 34 aufgebauten Lipidschichten 26 und 28, welche sich im Bereich der Arbeitsöffnung zu der Membran 32 vereinen. In die Lipidschicht 26 sind zusätzlich die Acetylcholinesterase-Enzymmoleküle 36 eingebaut. Auf etwa 10^4 Lipidmoleküle 34 kommt im Mittel ein Enzymmolekül 36.

Figur 3 zeigt schematisch den Aufbau eines Acetylcholinesterasemoleküles, wie er aus der oben genannten Veröffentlichung in Biochemical and Biophysical Research Communications

bekannt ist. Ein "*" bzw. ein "***" kennzeichnen unterschiedliche Stellen des Enzymmoleküles, an denen dieses durch Protolyse gespalten werden kann. Der lange Schwanz 38 des Enzymmoleküls 36 kann Verbindungen mit Lipidmolekülen eingehen; mit Kreisen sind jeweils katalytische Untereinheiten 40 gekennzeichnet, welche in Form dreier Tetramere vorliegen.

Bei der in Figur 1 wiedergegebenen biophysikochemischen Anordnung sind jeweils in eines der beiden Abteile 16, 18 eintauchende Kallomel-Elektroden 42, 44 vorgesehen, welche mit den Klemmen einer Betriebsschaltung 46 verbunden sind. Diese enthält einen mit einer Gleichspannungsquelle U_B verbundenen Vorwiderstand 48 und einen Gleichstromverstärker 50. Der Ausgang des Gleichstromverstärkers 50 ist mit dem Y-Eingang eines Y-t-Schreibers 52 und mit dem Eingang eines Frequenzzählers 54 verbunden. Das Ausgangssignal des Verstärkers 50 ist somit der Gesamtimpedanz des durch die Elektroden, die wässrige Lösung und die Membran gebildeten Strompfades zugeordnet. Diese hängt praktisch nur von der Impedanz der hochohmigen Membran 32 ab. Damit gibt das Ausgangssignal des Verstärkers 50 direkt die Leitfähigkeit der Membran 32 wieder.

Bringt man nun zusätzlich in das Abteil 16 eine geringe Menge ungerührten Acetylcholins ein, z.B. in Form einer 5×10^{-6} -molaren wässrigen Lösung von Acetylcholin⁺ Cl⁻, so erhält man auf dem Schreiber 52 diskrete Leitfähigkeitsimpulse mit einer Halbwertsbreite von 5×10^{-2} sec und einer auf die K⁺Cl⁻-Konzentration des wässrigen Milieus normierte Höhe von etwa $2 \times 10^{-10} (\text{Ohm} \times M \text{ K}^+ \text{Cl}^-)^{-1}$, wie in Figur 6 gezeigt ist. Bei noch genauerer Untersuchung der einzelnen Leitfähigkeitsimpulse mit höherer zeitlicher Auflösung kann man feststellen, daß diese ihrerseits eine rasche Aufeinanderfolge von sehr raschen Im-

pulsen mit einer Halbwertsbreite von einigen 10^{-4} sec darstellen. Letztere werden vermutlich jeweils dann erhalten, wenn ein Acetylcholinmolekül in den Einflußbereich eines Acetylcholinesterasemoleküls gelangt und dann katalytisch
 5 hydrolisiert und hierbei ein Proton freisetzt. Die Impulsfolge mit einer Gesamtdauer von 5×10^{-2} sec entspricht dagegen vermutlich der sukzessiven Hydrolyse einzelner zu einem Cluster gehöriger Acetylcholinmoleküle, wobei bei gegebenem Lösungsmittel die Anzahl der sich zu einem
 10 Cluster zusammenfindender Moleküle im wesentlichen konstant ist.

Sowohl die Leitfähigkeitsimpulse mit einer Halbwertsbreite von etwa 5×10^{-2} sec als auch die bei größerer zeitlicher
 15 Auflösung sichtbaren Leitfähigkeitsimpulse mit einer Halbwertsbreite von etwa 10^{-4} sec, wurden bisher nicht erhalten, da mit großen Konzentrationen an Enzymmolekülen und Substratmolekülen gearbeitet wurde.

20 Um einzelne Leitfähigkeitsimpulse zu erhalten, muß die Häufigkeit, mit der ein Auftreffen eines Substratmoleküles oder eines Substratmolekülclusters auf ein Enzymmolekül erhalten wird, so klein gehalten werden, daß sich die einzelnen Leitfähigkeitsimpulse in der weitaus überwiegenden
 25 Anzahl der Fälle zeitlich nicht überlappen. Diese Häufigkeit wächst offensichtlich mit der Konzentration der oberflächengebundenen Enzymmoleküle, mit der Konzentration der im wässrigen Milieu verteilten Substratmoleküle, mit der Größe des aktiven Membranbereiches und mit der Beweglichkeit der Substratmoleküle im jeweiligen flüssigen Milieu.
 30 In erster Linie über die verschiedenen Konzentrationen, aber auch über die Wahl der Temperatur der im Abteil 16 befindlichen Flüssigkeit sowie über die Größe des aktiven Membranbereiches läßt sich im Einzelfalle durch einfache
 35 Versuche sicherstellen, daß an der Membran diskrete ein-

zelne Leitfähigkeitsimpulse erhalten werden, andererseits der mittlere zeitliche Abstand der einzelnen Leitfähigkeitsimpulse nicht unnötig groß wird. Bei der Erhöhung der Impulsfrequenz durch Erhöhung der Konzentration an Substratmolekülen und/oder Enzymmolekülen kann man ohne weiteres so weit gehen, bis in seltenen Ausnahmefällen ein Impuls schon in die abfallende Flanke eines vorhergehenden Impulses fällt. Ein entsprechender Impulszug ist in Figur 7 wiedergegeben, in der die Einheiten auf den Koordinatenachsen genauso groß sind wie bei der Darstellung von Figur 6.

Die in Figur 1 gezeigte Anordnung läßt sich direkt auch zur Messung des pH-Wertes der im Abteil 16 befindlichen Flüssigkeit verwenden, da die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Acetylcholin in Gegenwart von Acetylcholinesterase vom jeweils angefundenen pH-Wert abhängt. Die von der Betriebsschaltung 46 abgegebene Frequenz bzw. die Anzeige des Frequenzzählers 54 ist so direkt ein Maß für den pH-Wert und braucht allenfalls für größere Abweichungen des gemessenen pH-Wertes vom pH-Bereich 7 - 7,5 unter zusätzlicher Verwendung von durch einen Versuch einmal leicht zu erstellenden Korrekturtafeln modifiziert zu werden.

Figur 2 zeigt einen Längsschnitt durch einen Strömungsmesser, welcher einen in einen Wasserstrom schaltbaren Rohrkörper 56 aufweist. Dieser ist in seiner Wand mit einer Öffnung 58 versehen, welche von einer Folie 60 überdeckt ist. Diese weist wiederum eine von einer Membran überdeckte Arbeitsöffnung auf, wie in Figur 2 gezeigt.

Auf die Rohraußenseite ist ein Behälter 62 aufgesetzt. In ihm befindet sich eine wässrige Salzlösung, z.B. eine 1-molare KCl-Lösung, in welche eine Kallomel-Elektrode 64 eintaucht. Eine zweite Kallomel-Elektrode 66 ist von dem

Wasserstrom im Inneren des Rohrkörpers 56 umspült. Die Elektroden sind wie in Figur 1 mit einer Betriebsschaltung 46 verbunden, deren Ausgang wieder mit dem Eingang eines Frequenzzählers 54 verbunden ist. Dieser hat eine
5 Periode von größenordnungsmäßig einer Sekunde, so daß für jede Ablesung eine große Anzahl von Leitfähigkeitsimpulsen erfaßt wird.

Stromauf der Öffnung 58 ist in der Wand des Rohrkörpers 56
10 eine weitere Öffnung 68 vorgesehen, in welche ein Körper 70 aus offenporigem Material eingesetzt ist. Die Öffnung 68 steht in Verbindung mit dem Inneren eines auf die Außenseite des Rohrkörpers 56 dicht aufgesetzten Vorratsbehälters 72, welcher eine wässrige Lösung von Acetylcholin
15 enthält, und ggf. zusätzlich von KCl, falls der zu messende Wasserstrom elektrisch sehr schlecht leitet.

Das Innere des Vorratsbehälters 72 ist über ein Druckregelventil 74 mit einer Vorratsflasche 76 für unter Druck stehendes Inertgas verbunden, so daß pro Zeiteinheit eine vorgegebene Menge Flüssigkeit aus dem Vorratsbehälter 72 in
20 den Flüssigkeitsstrom abgegeben wird, und zwar in dessen äußerste Randschicht.

25 Der oben beschriebene Strömungsmesser arbeitet folgendermaßen:

Beim Vorbeiströmen des im Rohrkörper 56 laminar fließenden Wassers nimmt dessen Randschicht aus dem Körper 70 Acetylcholincluster mit. Diese können nun im Wasserstrom in zur
30 Strömungsrichtung senkrechter Richtung, also von der Wand des Rohrkörpers zur Rohrkörperachse diffundieren. Je langsamer die Strömung ist, umso mehr Acetylcholincluster sind von der Rohrkörperwand wegdiffundiert, wenn die Randschicht des Wasserstromes die Folie 60 erreicht, umso
35

weniger Leitfähigkeitsimpulse werden vom Frequenzzähler 54 registriert. Der Stand des Frequenzzählers 54 ist somit direkt ein Maß für die Strömungsgeschwindigkeit des Wassers.

5

Für verglichen mit der Diffusionsgeschwindigkeit der Acetylcholincluster sehr hohe Strömungsgeschwindigkeiten kann man gerade umgekehrt die Einrichtung zum Einspeisen von Acetylcholinclustern in den Wasserstrom so ausbilden, daß die Abgaberate der Strömungsgeschwindigkeit des Wassers zugeordnet ist. Dies kann ähnlich wie bei einem Kraftfahrzeugvergaser unter Verwendung einer Venturidüse erfolgen, welche eine in der Düsenwand ausgebildete Zuführöffnung für die Acetylcholin-Lösung aufweist, die mit dem Vorratsbehälter 72 in Verbindung steht. Bei einem solchen Strömungsmesser wächst dann ebenfalls die Anzahl der pro Zeiteinheit bei der Folie 60 ankommenden Acetylcholincluster mit der Strömungsgeschwindigkeit.

20

Hat man dagegen verglichen mit der Diffusionsgeschwindigkeit der Acetylcholincluster sehr kleine Geschwindigkeiten des Wasserstromes zu messen, so kann man den Strömungsmesser nach Figur 4 um die dort gestrichelt eingezeichneten Bauteile erweitern, welche eine zweite biophysikochemische Anordnung darstellen und jeweils einem schon oben beschriebenen Bauteil entsprechen. Aus diesem Grunde sind diese Bauteile mit entsprechenden, jedoch zusätzlich mit einem Beistrich versehenen Bezugszeichen versehen.

25

30

Der Frequenzzähler 54 ist dann als Auf/Abzähler ausgebildet, dessen Aufwärtszählklemme + mit dem Ausgang der Betriebsschaltung 46 und dessen Abwärtszählklemme - mit dem Ausgang der Betriebsschaltung 46' verbunden ist.

35

Der Zählerstand des Frequenzzählers 54 entspricht somit

direkt der Abweichung der Bewegung der Acetylcholincluster vom bei Strömungsgeschwindigkeit Null erhaltenen völlig symmetrischen Diffusionsmuster und ist somit direkt der kleinen Driftgeschwindigkeit des Wasserstromes zugeordnet.

5

Man erkennt, daß bei den oben beschriebenen Strömungsmessern die Empfindlichkeit leicht durch Einstellung des Druckregelventiles 74 geändert werden kann, während mechanische Änderungen nicht notwendig sind. Man erkennt ferner, daß das Meßergebnis wiederum in für eine rauschfreie und rasche Signalaufbereitung vorteilhafter Frequenzmodulierung bereitgestellt wird.

Der in Figur 4 gezeigte Strömungsmesser läßt sich mit ganz wenigen Abwandlungen auch zum Messen eines elektrischen Feldes verwenden, da das Acetylcholin üblicherweise in Form eines polaren Salzes, z.B. $\text{Acetylcholin}^+ \text{Cl}^-$ zugegeben wird und die Wanderung des Acetylcholin^+ -Ionen durch ein äußeres elektrisches Feld in ähnlicher Weise beeinflußt wird wie durch die Mitnahme durch einen Wasserstrom. Hierzu braucht man nur auf die Enden des Rohrkörpers 56 in Figur 4 strichpunktiert eingezeichnete Deckel 78 aufzusetzen. Dann erhält man durch das angelegte äußere elektrische Feld wieder eine Unsymmetrie des Diffusionsfeldes der vom Körper 70 abgegebenen Acetylcholin^+ -Cluster, so daß die Betriebsschaltungen 46 und 46' mit unterschiedlicher Frequenz Impulse abgeben. Um eine Rückdiffusion von Acetylcholinclustern, welche an der Folie 60 unzersetzt vorbeilaufen, zu verhindern, kann man die Innenseite der Deckel 78 mit einer eine große Anzahl von Acetylcholinesterasemolekülen tragenden Membran überziehen, so daß die dort ankommenden Acetylcholincluster auf jeden Fall zersetzt werden.

35 Der soeben beschriebene Feldstärkemesser dient sowohl zur

Ermittlung der Feldrichtung als auch zur Ermittlung der Feldstärke, wozu man zunächst den Rohrkörper 56 so dreht, daß am Frequenzzähler 54 eine möglichst große Ablesung erhalten wird, und dann den Wert der Maximalablesung notiert.

Durch die oben beschriebene Anordnung wird automatisch auch der Einfluß einer etwa durch die entstehenden Reaktionsprodukte hervorgerufenen Verlangsamung der Reaktion kompensiert, da von dieser Verlangsamung beide Folien 60 und 60' in gleicher Weise betroffen sind. Nach längerer Meßdauer wird die verbrauchte, Acetat-reiche Lösung im Inneren des Rohrkörpers 56 verworfen und durch neue Lösung ersetzt, wozu entsprechende Anschlüsse am Rohrkörper 56 vorgesehen werden.

Figur 5 zeigt einen Aufbau zur Untersuchung von Reaktionen an oberflächengebundenen Enzymmolekülen, welcher ähnlich zu dem in Figur 1 gezeigten ist; entsprechende Teile sind wieder mit denselben Bezugszeichen versehen und brauchen nicht noch einmal im einzelnen beschrieben zu werden. Die Anordnung ist im betriebsbereiten Zustand, also nach Herstellung der durch Lipid-Doppelschichten gebildeten Membranen wiedergegeben, die im übrigen nicht näher gezeigt sind.

Der Boden des Behälters 10 weist nun einen zweiten Schlitz 12' auf, in welchem eine zweite Trennwand 14' genauso verschiebbar angeordnet ist wie die Trennwand 14 im Schlitz 12. Die Trennwand 14' hat eine Öffnung 20', welche von einer Folie 22' überdeckt ist. Insoweit besteht völlige Übereinstimmung mit den schon oben beschriebenen Anordnungsteilen.

Die in Figur 5 nicht wiedergegebene Arbeitsöffnung der

Folie 22' ist wiederum von einer Membran überdeckt, welche durch eine Lipid-Doppelschicht gebildet ist. Diese Membran trägt nun aber ihrerseits andere Enzymmoleküle als die Membran der Folie 22, nämlich solche, die in ihrem Zusammenwirken mit ihnen zugeordneten Substratmolekülen untersucht werden sollen. Diese Substratmoleküle befinden sich ebenfalls in dem wässrigen Milieu des Abteiles 16. Um zu verhindern, daß sie direkt mit den Substratmolekülen für die Enzymmoleküle der Membran der Folie 22 reagieren, und um zu verhindern, daß Substratmoleküle für die Enzymmoleküle der Membran der Folie 22 mit den Enzymmolekülen der Membran der Folie 22' reagieren, ist das Abteil 16 durch eine Wand 80 unterteilt, welche nur für die Reaktionsprodukte der katalytischen Zersetzung von Substratmolekülen an der Membran der Folie 22' durchlässig ist, z.B. für Protonen.

Die in Figur 5 gezeigte Anordnung besteht somit aus einem links der Wand 80 liegenden Versuchsteil und einem rechts der Wand 80 liegenden Meßteil. Man erkennt, daß die Versuchsanordnung nach Figur 5 sehr einfachen Aufbau aufweist und auch den Verlauf von durch Enzyme katalysierten Reaktionen von Substratmolekülen zu untersuchen gestattet, wenn die Enzymmoleküle von Membranen getragen werden sollen, die selbst keine oder nur eine sehr geringe Leitfähigkeitsänderung zeigen. Man kann so unter anderem auch Reaktionen an molekularen Einfachschichten untersuchen.

Auch einen Temperaturmesser kann man mit einer obenstehend beschriebenen biophysikochemischen Anordnung leicht realisieren, da bei festgehaltenen übrigen Betriebsparametern die Beweglichkeit der Substratmoleküle bzw. - Cluster im flüssigen Milieu von der Temperatur abhängt.

So ist bei der Anordnung nach Figur 1 bei fester Konzentra-

22-07-80

3028569

978/RO/p

- 21 -

26.7.1980.

22

tion von Substratmolekülen und Enzymmolekülen, gleichem
flüssigem Milieu und gleicher Geometrie die Frequenz der
Leitfähigkeitsimpulse ein Maß für die Temperatur des flüs-
sigen Milieus im Abteil 16, da die an der Membran 32 durch
5 die Enzymmoleküle 36 zersetzten Substratmoleküle durch tem-
peraturabhängige Diffusion aus dem Volumen des flüssigen
Milieus ersetzt werden müssen. Das Abteil 16 braucht also
bei Verwendung der Anordnung nach Figur 1 nur thermisch
an den Gegenstand angekoppelt zu werden, dessen Temperatur
10 gemessen werden soll.

15

20

25

30

35

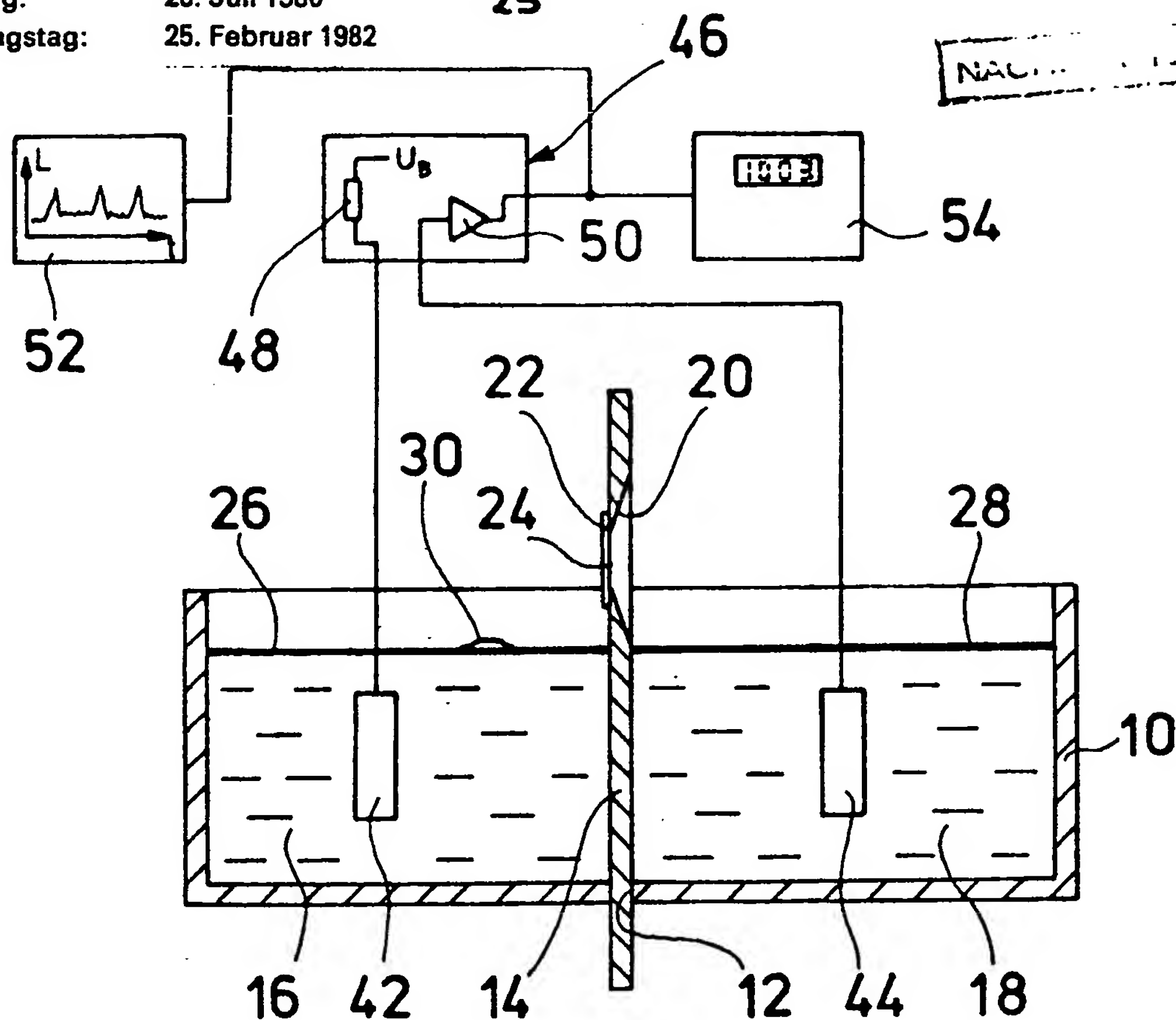


Fig. 1

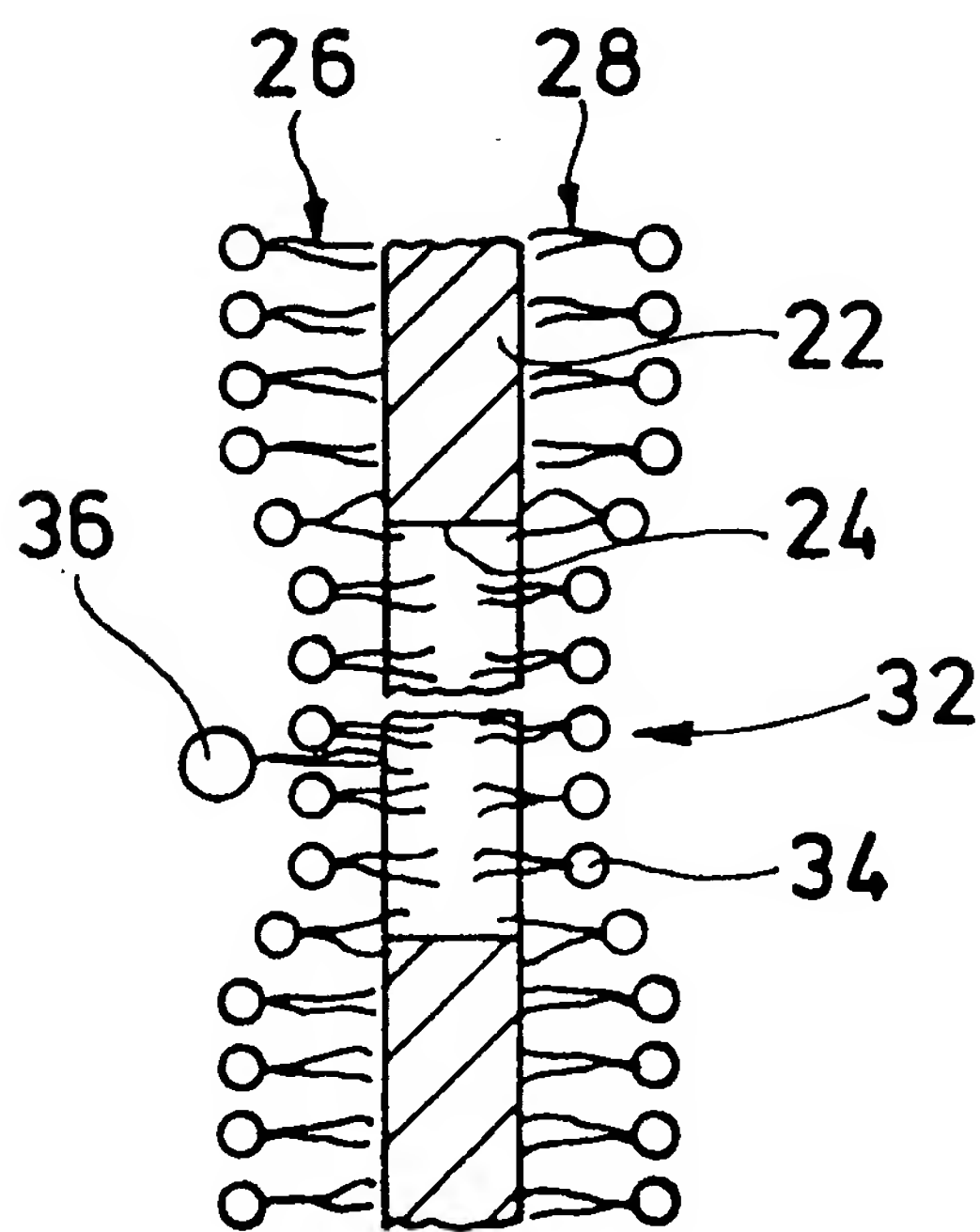


Fig. 2

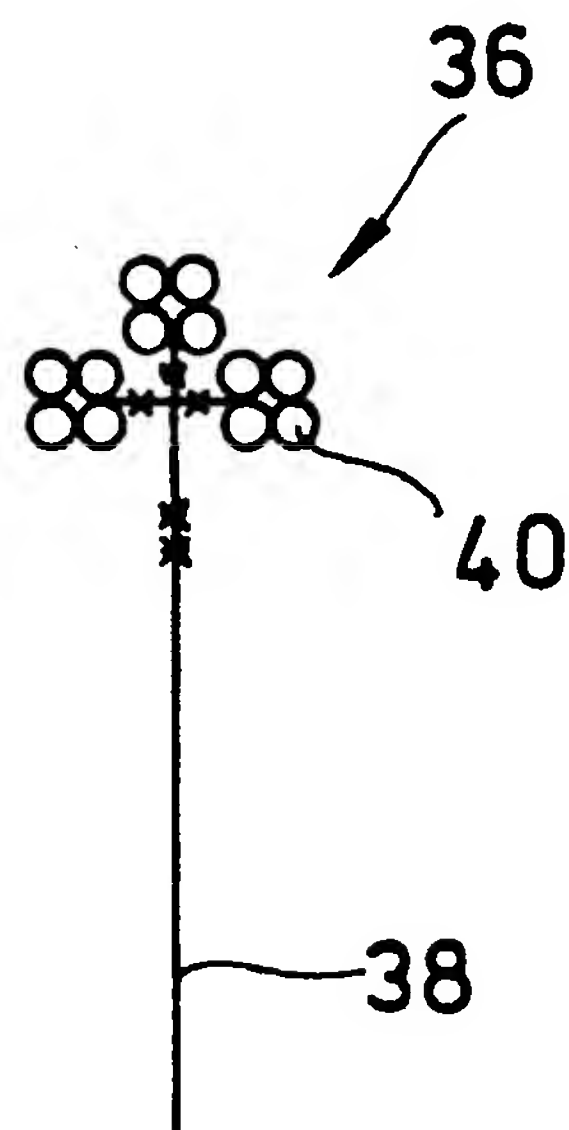


Fig. 3

NACHGEREICHT

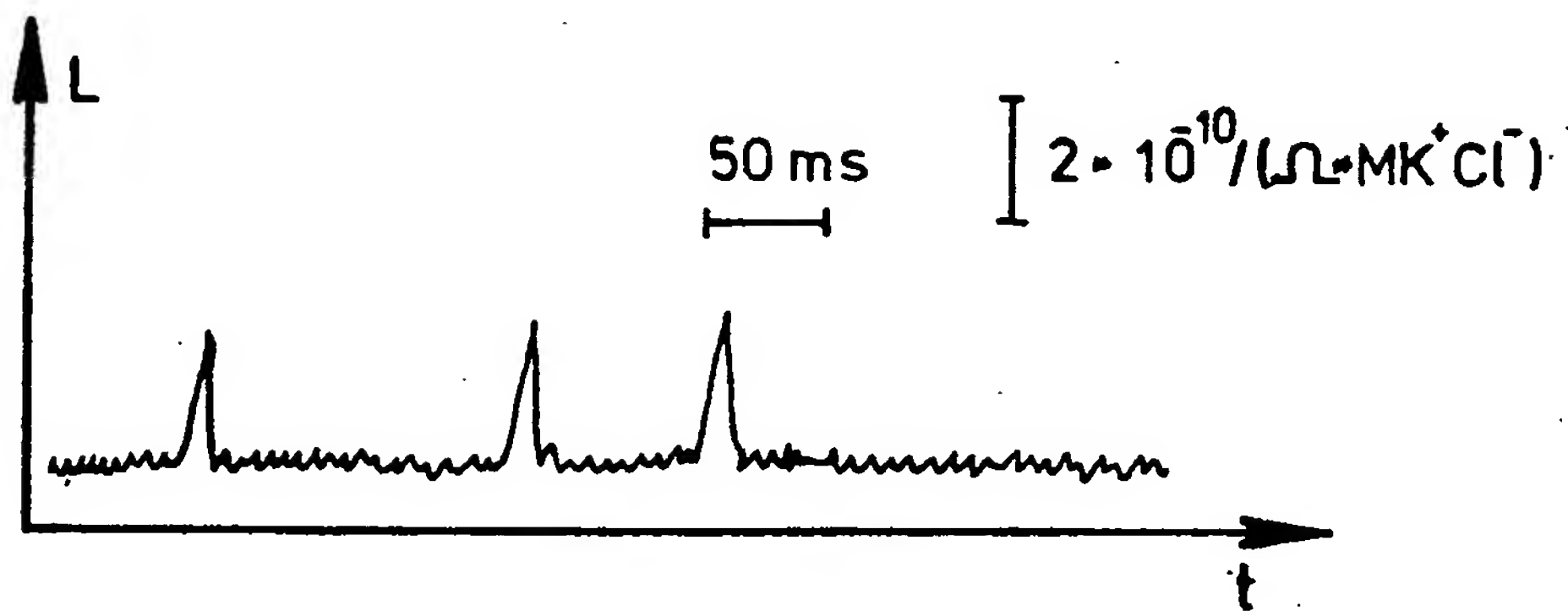


Fig.6

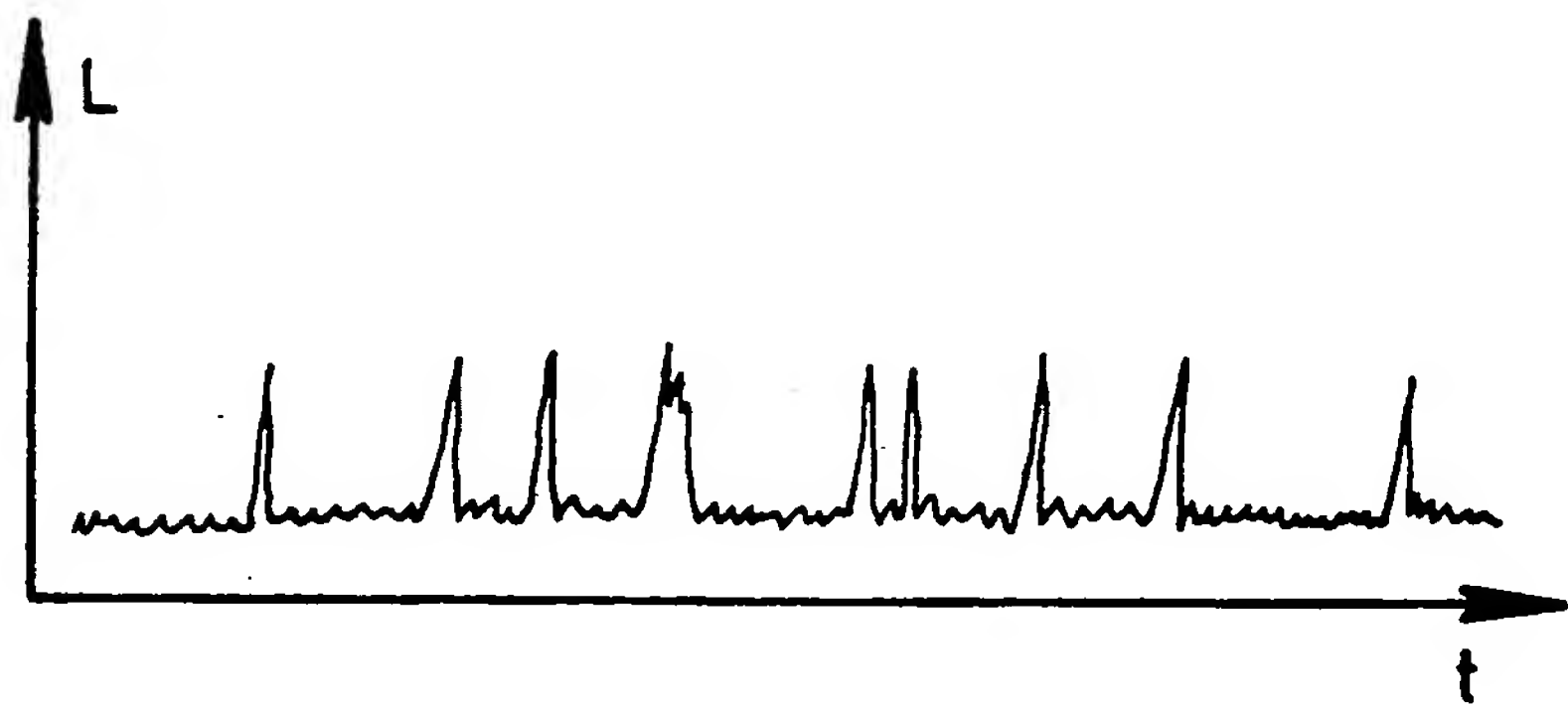


Fig.7